

Title	ヒト腎細胞癌の基礎的研究 第5報：ヒト腎細胞癌に由来する細胞株OUR-10の性質について
Author(s)	松田, 稔; 長船, 匡男; 中野, 悦次; 石橋, 道男; 古武, 敏彦; 園田, 孝夫; 渡辺, 信一郎; 波田, 寿一; 大河内, 寿一; 東野, 一彌; 山村, 雄一; 平岡, 諦
Citation	泌尿器科紀要 (1980), 26(3): 253-264
Issue Date	1980-03
URL	http://hdl.handle.net/2433/122617
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

ヒト腎細胞癌の基礎的研究

第5報：ヒト腎細胞癌に由来する細胞株 OUR-10 の
性質について

大阪大学医学部泌尿器科学教室（主任：園田 孝夫教授）

松田 稔・長船 匡男・中野 悦次
石橋 道男・古武 敏彦*・園田 孝夫

大阪大学医学部第3内科学教室（主任：山村 雄一教授）

渡辺 信一郎・波田 寿一・大河内 寿一
東野 一彌・山村 雄一

大阪大学医学部第2内科学教室（主任：垂井清一郎教授）

平岡 諦

A FUNDAMENTAL STUDY OF RENAL CELL CARCINOMA
PART 5. ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A NEW CELL
LINE DERIVED FROM HUMAN RENAL CELL CARCINOMAMinoru MATSUDA, Masao OSAFUNE, Etsuji NAKANO,
Michio ISHIBASHI, Toshihiko KOTAKE and Takao SONODA*From the Department of Urology, Osaka University Hospital**(Chairman: Prof. T. Sonoda, M. D.)*Shin-ichiro WATANABE, Toshikazu HADA, Toshikazu OKOCHI, Kazuya HIGASHINO
and Yuichi YAMAMURA*From the Third Department of Internal Medicine, Osaka University Hospital**(Chairman: Prof. Y. Yamamura, M. D.)*

Akira HIRAOKA

*From the Second Department of Internal Medicine, Osaka University Hospital**(Chairman: Prof. S. Tarui, M. D.)*

A cell line, designated as OUR-10, was established from a human renal cell carcinoma. This cell line have been maintained for more than 28 months with a passage of 1 week interval. Under inverted microscopy, confluent monolayer of the OUR-10 was composed mainly with polygonal epithelial cells with small round cells or dendritic cells and characterized by the absence of contact inhibition. With electron microscopy, differentiated cell surface structure looking like microvilli, which was a characteristic fine structure of the human renal cell carcinoma cells, were observed. Karyological analysis revealed hypodiploid modal chromosome numbers of 39 and 40. Marker chromosomes with obvious structural anomalies were not detected but non-random loss of three chromosomes in Group D and one in Group E were recognized. The doubling time was approximately 32 hours at the 50th generation. The cells could not form proliferating nodules in the back of the nude mice, even pretreated with cyclophosphamide or X-ray irradiation. But heterotransplantation into the

* 現 大阪府立成人病センター泌尿器科

cheek pouch of immunosuppressed hamsters formed tumors, which showed impressive similarity to the original cancer on histology. To clarify the origin of the cell line, several enzymological studies were performed and the γ -GTP isozyme contained in the cell line was confirmed to be the same with the novel isozyme detected in about a half of the renal carcinoma tissues. Genetic phenotype of the G6PD was identified as B, and the HLA antigenic structure was A2, 11; B5, 40, which were clearly different from the characters of HeLa cells.

はじめに

試験管内において安定した状態で増殖するヒト悪性腫瘍細胞を得ることは、癌の細胞学的、生化学的、免疫学的研究や、放射線、薬剤に対する感受性の検討、あるいは分化の再誘導など、きわめて広汎かつ未開拓な分野において研究を進めるにあたり、非常に重要なことと考えられる。著者は本報告第1報¹⁾においてすでに述べたように、過去数年、ヒト腎細胞癌の単層培養を試みてきた。そして最近それらのうちの1例より得た細胞が培養開始後28か月以上を経過し、さらに順調に増殖をつづけていることが確認され、またこの細胞の由来も生化学的手段により同定されたと考えられるに至った。OUR-10と名付けられたこの細胞の性質の一部についてはすでに報告²⁾し、本稿の内容にはそれと重複する点があるが、過去の著者のおこなってきた一連のヒト腎細胞癌の基礎的研究の重要な一부를なすものと思われるので、ここにOUR-10の性質につき詳細に報告したい。

材料ならびに方法

1. 由来組織

培養に供され、OUR-10が樹立された腫瘍組織はつぎのような症例より得られたものである。

症 例

患者：32歳 女子

家族歴：特記すべきことなし。

既往歴：31歳、帯状疱疹。

主訴：左鎖骨上窩腫瘍。

現病歴：1977年1月、左鎖骨上窩の腫瘍に気付き、当院第1外科受診、ただちに腫瘍の生検がおこなわれ、renal cell carcinoma, clear cell type 組織診断が得られ、同年3月の7日当科に紹介された。これらの期間中発熱はなく、腹部腫瘍も自覚しなかったが、ときどき、軽度の左腰部疼痛を感じていた。

現症：体格中等度。栄養普通。貧血認めず。左鎖骨上窩リンパ節、大豆大、硬、多発性に腫大、相互に癒合傾向を認む。胸部異常なし。腹部、平坦、軟。左季肋部に軽度の圧痛、肝、脾、右腎は触知しないが、左腎下極をやや硬くふれる。四肢、神経学的に異常なく、

浮腫も認められない。

検査成績：血圧 150/102mmHg, 体温 36.7/C, 脈拍 85/min 整。赤沈1時間 2mm, 血液型 O 型, Rh(+), 検血；赤血球 $394 \times 10^4/\text{mm}^3$, Hb 12.5 g/dl, Ht 36.1%, 白血球 $5000/\text{mm}^3$, (St. 6%, Seg. 53%, Eosino. 3%, Baso. 1%, Lympho. 35%, Mono. 5%), 止血機能；出血時間4分, 血小板 $22.7/\text{mm}^3$, 線溶現象(-), PTT 37秒, プロトロンビン時間 88%, フィブリノーゲン 286 mg/dl. 血液化学；Na 138 mEq/L, K 3.9 mEq/L, Cl 103 mEq/L, Ca 10.2 mg/dl, 無機リン 3.4 mg/dl. BUN 18.1 mg/dl, クレアチニン 0.7 mg/dl, 尿酸 4.7 mg/dl, グルコース 85 mg/dl. 肝機能；T.P. 6.7 g/dl, A/G 1.5, GOT 16.5 u, GPT 8.0 u., γ -GTP 9.9u, I. I. 8, アルカリフォスファターゼ 7.1 K-Au, 検尿；外觀黄色透明, pH 7.3, protein (-), suger (-), 沈渣 赤血球(+), 白血球(-), 結晶(-), 円柱(-), 細菌(-).

胸部X線；異常なし。

心電図；異常なし。

IVP；右腎は正常であるが、左腎盂には圧迫による変形が著明である (Fig. 1)。

腎血管造影；左腎上極より中央部にかけ腫瘍が認められる。腫瘍の内縁部では特に血管網が豊富であり、pooling, puddling などの腫瘍性変化を示している (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。

手術所見：上記の結果より左腎腫瘍と診断し、1977年3月14日、GO-NLA 麻酔のもとに transabdominal nephrectomy が施行された。腫瘍は腎周囲組織との癒着は少なく、肉眼的に周辺への浸潤はみられなかったが、腎茎部に2個の小児拳大に腫大したリンパ節がみられ、左腎とともに摘出した。

摘除標本：Fig. 3 に示すような重要 650g の腫瘍であり、腎下極部のみがほぼ正常の外観をもって残存していた。剖面では腫瘍の中心部は赤色軟にて壊死状であるが周辺部は黄色を呈し、やや硬く、正常腎実質とは明らかな腫瘍被膜により境されていた。なお同時に摘除されたリンパ節の剖面も Fig. 3 に示されているが、その性状は腎腫瘍のものと同じであった。

病理学的所見：中等度の核異形性をもつ clear cell

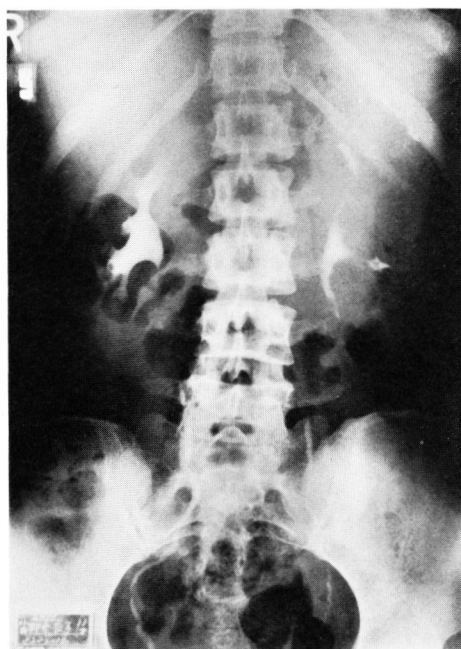


Fig. 1. IVP 15分像. 右腎には変化は認められないが左腎輪廓は拡大し、腎盂は延長し、圧迫による変形が著しい。

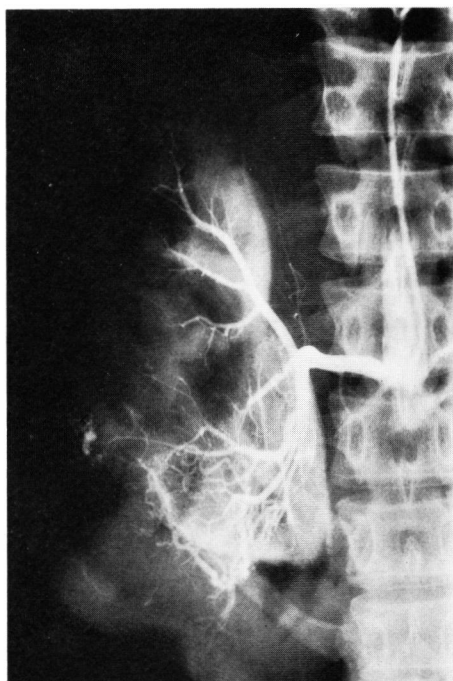


Fig. 2-1. 選択的腎血管造影, 動脈相. 左腎上極から中央部にかけ、腫瘍性病変がみられる。

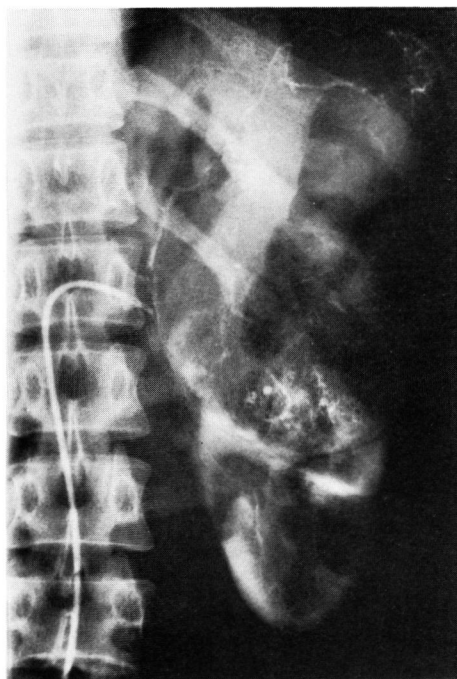


Fig. 2-2. 選択的腎動脈造影, 静脈相, pooling, puddlingの所見は腫瘍周辺部で著明である。

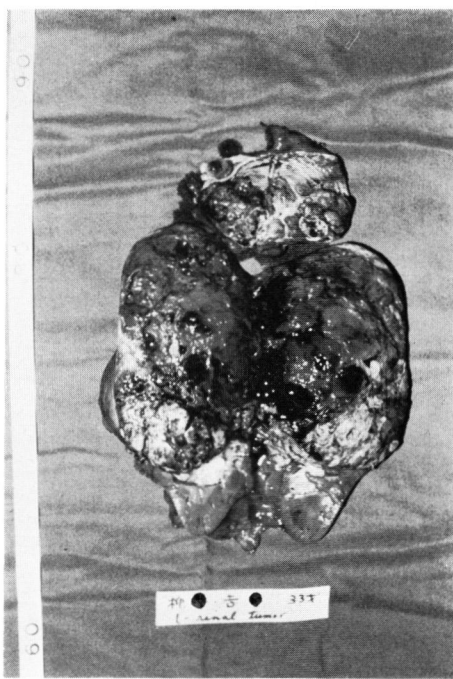


Fig. 3. 摘除標本剖面. 中心性壊死をみとめるが正常腎実質とは被膜により明らかに境されている。上半は同時に切除したリンパ節の断面を示す。

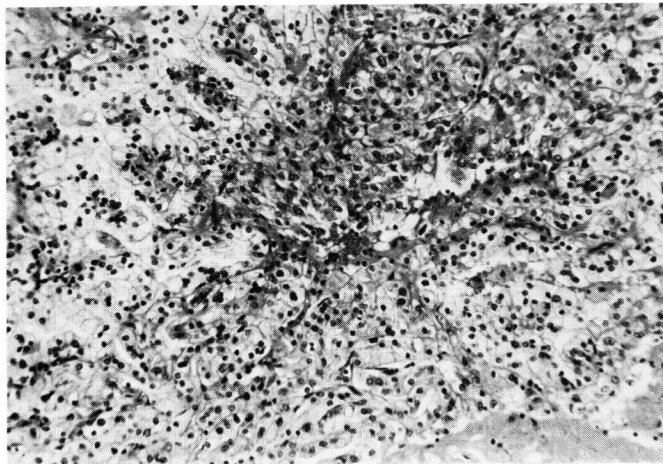


Fig. 4-1. 原発巣病理組織所見. 大部分 clear cell, 一部 granular cell よりなる (H & E, $\times 200$).

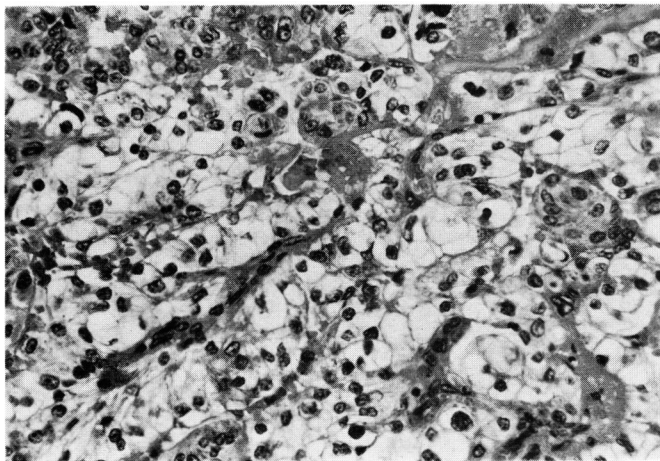


Fig. 4-2. 原発巣病理組織所見. 中等度の核異型性を示す (H & E. $\times 400$).

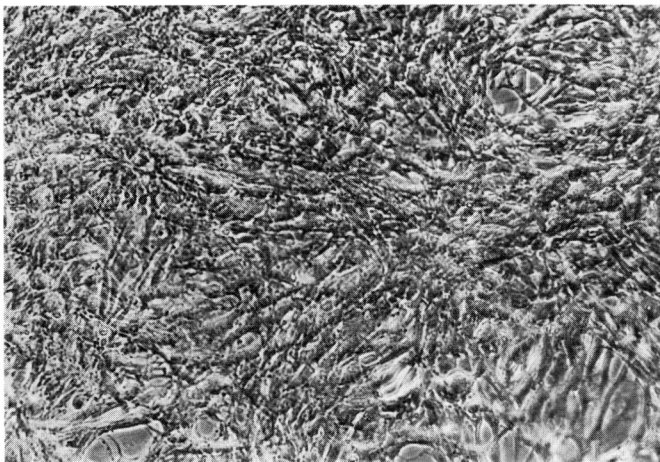


Fig. 5. Primary culture, 1週間目. 敷石状配列をとり, 一部 fibroblastic cell の混入も認められる (倒立顕微鏡 $\times 100$).

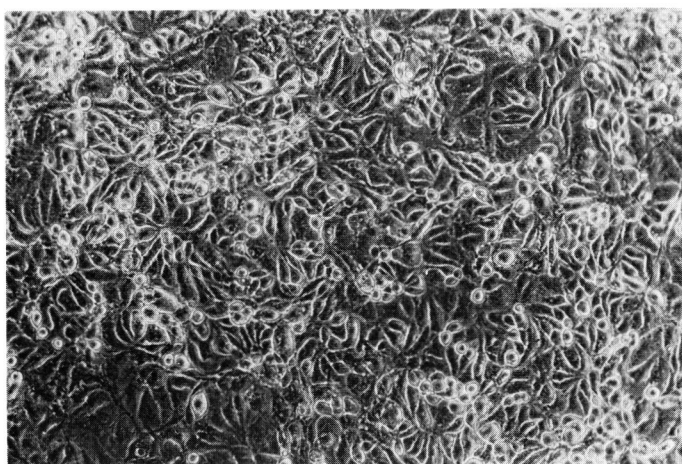


Fig. 6-1. 培養開始後14月日(55代)大部分上皮様細胞よりなり、一部に小さな丸い細胞や樹枝状の細胞も混在する(倒立位相差顕微鏡, $\times 200$).

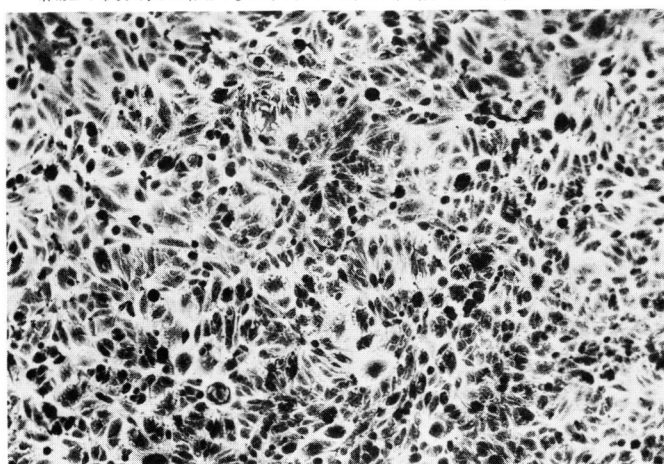


Fig. 6-2. 培養開始後14ヵ月目(Giemsa 染色 $\times 100$).

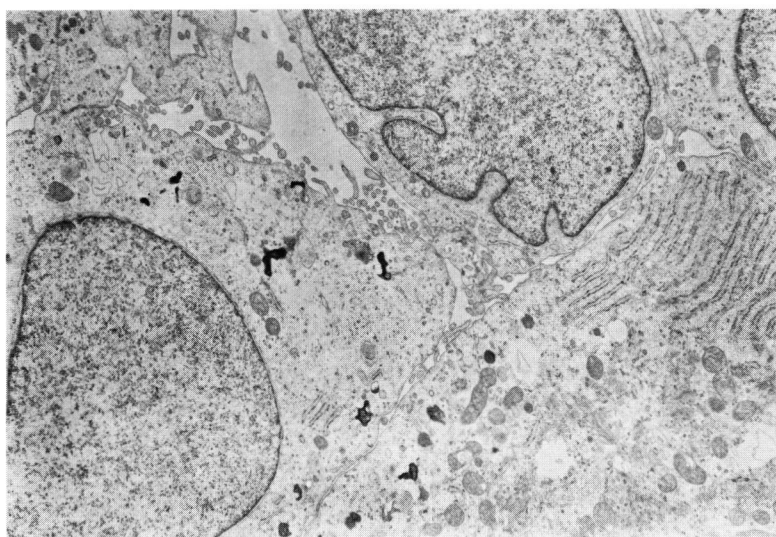


Fig. 7. 電子顕微鏡所見. やや偏在する核を有し, 細胞内のミトコンドリア, 小胞体の発育はよい. 細胞膜の一部に microvilli 類似した構造もみとめられる($\times 3500$).

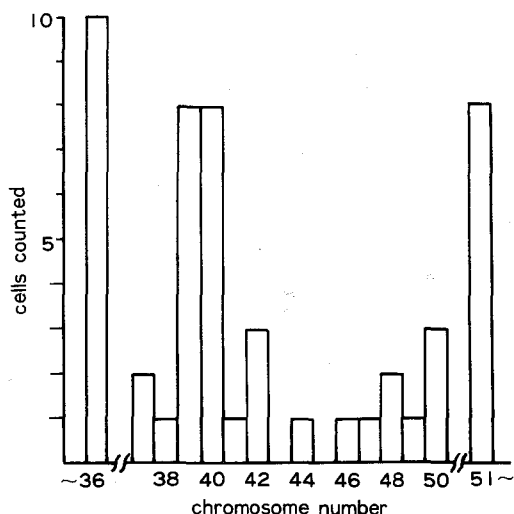


Fig. 8. 培養開始後12カ月目の染色体数の分布. 染色体数39~40にモードを有する

が小胞巣状あるいは腺管状に配列する腎細胞癌であるが, granular cell の混在も認められる (Fig. 4-1, 4-2).

術後経過: 術後経過に異常なく, 術後14日目より左鎖骨上窩および大動脈周囲リンパ節に対し総量 5000 rad の放射線療法を施行した. さらに medroxyprogesterone acetate (Provera®) 100 mg/day の経口投与を約4カ月間施行, ついで OK-432 による免疫療法や ifosfamide による化学療法も施行したが, 術後1年4カ月目, 腫瘍の局所再発, 肝, 骨, 肺転移により死亡した.

2. 培養方法

原発巣よりただちに腫瘍組織約 3g を切り出し, 壊死部や線維性組織をのぞきつつ, Hanks' balanced salt solution にて充分洗滌後細切し, 0.25% trypsin (in phosphate buffered saline (Ca⁺⁺(-)). 阪大微研製) を約 10ml 加え, 磁気攪拌器にて細胞分散をおこなった. 分散された細胞を 1000 rpm, 10分の遠心により集め, 以下にのべる培養液にて数回洗滌した. ついで生細胞数, 約 1×10^6 /ml の細胞浮遊液とし, TD 40培養瓶 (池本理工工業) に約 10ml を移し, ただちに5%炭酸ガス存在下に 37°C にて静置培養を開始した. 使用した培養液は RPMI 1640 に抗生物質 (streptomycin 100 µg/ml, penicillin 100 u/ml) および 20% 非動化 fetal bovine serum (Microbiological Associates, Walkersville, Md. USA) を加えたものを一貫して使用した.

3. 形態学的観察

単層状態に増殖する細胞を倒立 (位相差) 顕微鏡にて観察, またはスライドグラス上に増殖させた細胞を

ホルマリン固定後, Giemsa, hematoxylin-eosin, PAS, Sudan III 染色にて観察した. 電子顕微鏡的観察は, 単層細胞を通常のグルタルアルデヒドおよびオスミウム酸の2重固定後, rubber policeman にて細胞を集め, 2000g にて遠心, 得られた cell pellet を細切, アルコール系列にて脱水後 Epon 包埋, 超薄切片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛にて後染色し観察した.

4. 細胞増殖速度

培養開始後4カ月目に, TD 10 試験管 (池本理工工業) に 1×10^5 個/ml の細胞浮遊液を 1ml 加え, 5°傾斜培養, 培養液は週2回の交換をおこなって測定し, また12カ月目には petri dish (Falcon 3001) に同様の細胞浮遊液を 2ml 加え, 培養液は隔日に交換する条件で, 毎日細胞数をカウントし, 片対数グラフ上にプロット, 細胞数倍加時間を算定した.

5. 染色体分析

対数増殖期にある細胞をコルセミド (0.06 µg/ml) とともに約4時間培養後, 0.25% trypsin にて細胞を単離, 低張処理, 固定 (メタノール: 酢酸=3:1 vol/vol) 後, 空気乾燥標本を作成, Giemsa 染色をおこない, 分裂中期の核型を約50枚写真撮影し, 分析した.

6. 異種動物移植実験

日本クレア株式会社より得た BALB/c 由来雄ヌードマウス背部皮下, および Kaufman and Lichtenauer の方法⁴⁾により免疫抑制をおこなった雌 syrian golden hamster の cheek pouch に 1×10^7 個の細胞を phosphate buffered saline に浮遊し接種した.

7. 生化学的検索

7-1) glucose 6- phosphate dehydrogenase (G6PD) OUR-10 細胞ならびに, 10% fetal bovine serum 添加 Eagles minimum essential medium にて培養せる HeLa 細胞 (大日本製薬株式会社, 組織培養センターより入手) の cell pellet を 1mM EDTA および 1mM β-mercaptoethanol を含む 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 とともにホモジナイズし, この 13000g, 30 分の遠心 上清を 7.5% ポリアクリルアミドディスク電気泳動にかけ, 比較検討した.

7-2) alkaline phosphatase (Al-p)

腫瘍組織および OUR-10 細胞のホモジネートより Morton, 法⁵⁾にて Al-p を抽出し, これより30%~70%アセトンにて沈澱する分画を得, これを 20mM Tris-HCl buffer pH 7.9 に対し1夜透析し, これを酵素標品とした. アイソザイムは荻田⁷⁾の方法により5%薄層ポリアクリルアミドを支持体とする電気泳動により分離し, 活性帯の検出は基質として α-naphthyl acid phosphate を用い, Fast blue BB salt にて発色

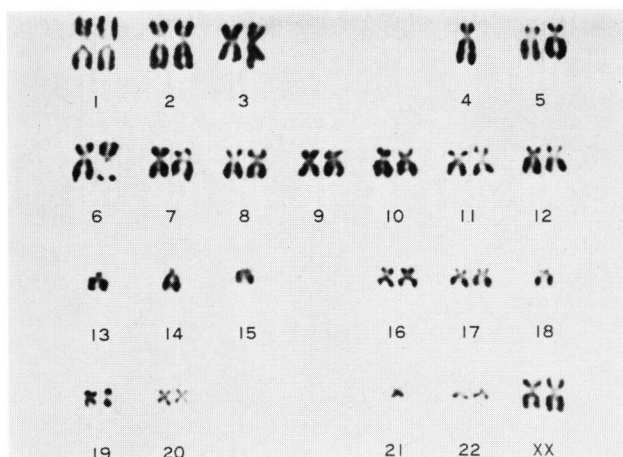


Fig. 9-1. 染色体数40を示す細胞の核型の1例. Fig. 9-2 の所見などと合わせD群3個E群1個の non-random loss がこれらの共通所見と判断される.

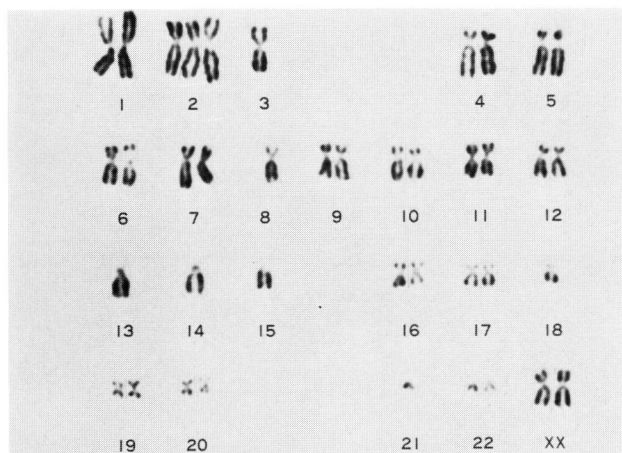


Fig. 9-2. 染色体数の40細胞の核型の1例. 前記した所見以外の変化もみられるがこれらは必ずしも他の細胞とも共通した変化ではない.

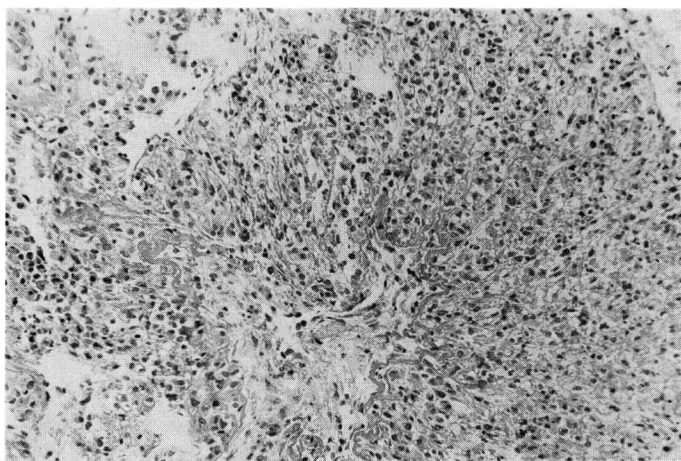


Fig. 10. ハムスター類袋に移植後7日目の細胞像. 原発巣病理所見と一部類似した所見を呈する (H & E, ×100).

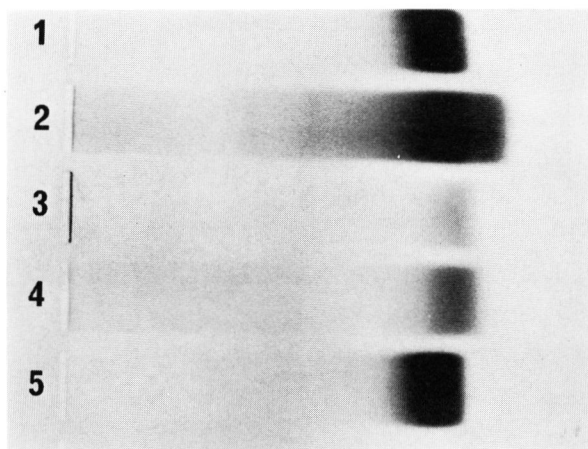


Fig. 11. 腫瘍組織および OUR-10 細胞より抽出される Al-p の薄層電気泳動像. 1 および 2; 肝型 Al-p, 原発巣組織 Al-p, 肝型および Kasahara isozyme が認められる. 3; OUR-10 細胞の Al-p, 大部分泳動原点にとどまるが弱い活性が肝型と Kasahara isozyme の間にみとめられる. 4; OUR-10 細胞を 1 mM dibutyryl cyclic AMP 培養すると, 大部分が 3 でみられる弱い活性帯に移行する.

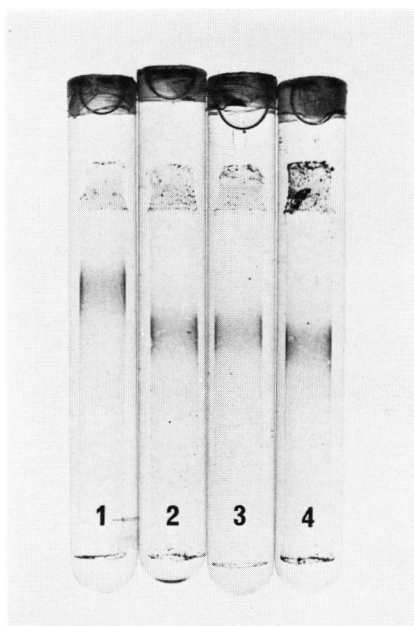


Fig. 12. γ -GTP デイイク電気泳動像; 1, 正常腎; 2, 原発巣腫瘍組織; 3, OUR-10 細胞; 4 正常肝 2 および 3 の同一性は OUR-10 の腎細胞癌由来を強く示唆する.

せしめる方法によった。

7-3 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)

組織および培養細胞よりの γ -GTP の抽出およびポリアクリルアミドディスク電気泳動法については本報告第3報にて詳述したとおりである⁸⁾。

7-4) lactic dehydrogenase (LDH)

由来組織ならびに培養細胞よりの LDH 酵素標品は G6PD と同様の方法により作成し、アイソザイムは 0.8% 寒天ゲルを使用した LDH Isozyme-Test kit (和光純薬工業) により分離し、おのおのの活性は島津 CS 210 クロマトスキャナーにて、550nm にて densitometry をおこない測定した。

8. HLA 抗原

Ficoll-Conray 法により分離した患者の末梢血リンパ球、ならびに 0.25% trypsin にて単離した OUR-10 細胞について Terasaki and MacClelland の方法⁹⁾により HLA 抗原の検索をおこなった。

結 果

1. 樹立経過および形態学的観察

培養開始後 7 日目には Fig. 5 に示すような散播状、あるいは敷石状に配列する上皮様単層細胞が得られ、その増殖も良好であった。2 週間目にはほぼ full sheet の状態となり、一部ではすでに piling up の傾向もみられた。3 週間目に 0.25%, trypsin にて細胞層を剥離せしめ単離後、2 つの TD40 培養瓶に継代したところ 2 日目にはすでに大部分の細胞が底面に付着し、4 日目にはほぼ完全に monolayer の状態となり、増殖も良好であった。その後約 1 週間に 1 度の割合で継代をつけたが、細胞の形態には特に著明な変化のないまま、また増殖も不良となることなく 28 カ月 (110 代) を経過し、株細胞と認められる状態に至っている。Fig. 6-1, 6-2 に 14 カ月目の細胞形態を示したが、大部分多角型、一部円型、紡錘型あるいは樹枝状の細胞を混じる上皮様細胞であり、単核、明瞭な核小体を 1 つあるいはそれ以上有する。PAS 染色にて陰性、Sudan III 染色にて細胞質内に一部陽性顆粒を認めた。電子顕微鏡的には細胞膜質内にミトコンドリアおよび粗面小胞体が比較的多くみられ、また電子密度の高い顆粒が散見される。細胞膜の一部には microvilli に類似した構造は認められるが、desmosome による細胞間接合はみられなかった (Fig. 7)。

2. 細胞数倍加時間

4 カ月目時点では 68 時間、12 カ月目の測定では 32 時間と測定された。

3. 染色体分析

培養開始後 12 カ月目の染色体数の分布を Fig. 8 に

示すが、染色体数 39~40 にモードを有していた。核型分析をおこなうと、この低 2 倍体性細胞の特長は、Fig. 9-1, 9-2 にも示すとおり、D 群 3 個、E 群 1 個の non-random loss と考えられた (他の染色体の変化は random なもので、共通する所見ではない)。20 カ月目におこなった分析でもほぼ同様の結果を得たが、染色体数 39~40 を有する細胞の割合がやや減少し、2~3 倍体付近の染色体数を有する細胞がやや増加する傾向を示した。

4. 異種移植

OUR-10 を nude mouse に移植すると移植後 7~14 日間は腫瘍はやや増大の傾向を示すが、以後自然に退縮をはじめ 3~4 週で完全に消失する。この経過は nude mouse に cyclophosphamide の前投与や大量の X 線照射をおこなっても同様であった。ハムスターの cheek pouch には移植後約 1 週間で径約 8 mm の腫瘍を形成する。組織所見は Fig. 10 のように一部由来腫瘍組織に類似する印象を与えるが中心性壊死を示し、この腫瘍も移植後約 3 週間で退縮した。

5. 生化学的性質

5-1) G6PD

OUR-10 のもつ G6PD は HeLa 細胞のもつ A 型酵素¹⁰⁾よりも、ポリアクリルアミドディスク電気泳動にて陰極寄りに泳動され、B 型と判定された。

5-2) Al-p

Fig. 11 に結果を示したが、由来組織の Al-p は肝型および Kasahara isozyme を有していた¹¹⁾。しかし OUR-10 細胞からは大部分が泳動原点にとどまる高分子 Al-p が抽出され、これとは別に、肝型と Kasahara isozyme の中間にきわめて弱い活性帯がみられた。試みに OUR-10 を 1mM, dibutylryl cyclic AMP とともに培養したところ高分子 Al-p は減少し、大部分がこの肝型と Kasahara isozyme の中間に泳動される酵素として抽出されるように変化した。

5-3) γ -GTP

腎細胞癌組織内には正常腎、胎児腎、正常肝の γ -GTP とは電気泳動易動度のことなる特異な isozyme がみられる場合のあることは本報告第 3 報⁸⁾にて詳述したが、由来組織ならびに OUR-10 細胞のいずれからもこの腎細胞癌にともなう γ -GTP isozyme が検出された (Fig. 2)。

5-4) LDH

LDH isozyme のパターンは、LDH 1-LDH 5 の順に、由来組織では 20.0, 24.0, 24.5, 21.1, 10.3% であり、OUR-10 細胞では 24.0, 28.3, 25.7, 15.8, 6.1% と比較的類似したパターンを示した。同時に検討した

ヒト正常腎皮質では 40.7, 33.6, 17.4 6.6, 1.7%, HeLa 細胞では 6.6, 25.0, 32.5, 29.9, 6.0 とそれぞれ OUR-10の細胞とはこととなったパターンを呈した。

6. HLA 抗原

症例の末梢血リンパ球 HLA 抗原は A2, 11; B5, 40, であり OUR-10 細胞も同じ抗原構造を示した。

考 察

1952 年 Gey によりヒト子宮頸癌細胞が HeLa 細胞として樹立されて以来、今日までヒト癌細胞の長期培養は多数の研究者により試みられてきた。そして 1975 年版で American Tissue Type Culture Collection に登録されているヒト由来癌細胞株は 63 種にも達しており、またこの他にも登録されないままに各種の研究に供されているヒト癌細胞株の数は少なくともこの数倍に達するであろう。しかしながら第 1 報でも述べたようにヒト腎細胞癌の長期培養にはいまだ成功例が少なく、1979 年 9 月現在、著者の知る範囲内では、本邦では KU-2,¹²⁾ NRC-12¹³⁾ および HGEp-1¹⁴⁾ の 3 種にすぎず、また本邦以外において樹立された細胞株もいくつかあるが¹⁵⁻²¹⁾、比較的その性質につきよく検討されているものは最近 Hoehn and Schroeder²²⁾ により報告された NC 65 だけといっても過言ではない。

さて日本組織培養学会の規準²³⁾によれば、細胞株は、1 年以上および 50 代以上継代した細胞と規定されている。著者の樹立した OUR-10 は明らかにこの規準を満たしており、また Hayflick 効果としてよく知られているように²⁴⁾、正常細胞は 12 カ月以上の長期培養は不可能であるとの報告を事実として認めるならば、すでに無限の長期に継代が可能な状態にあると考えられる。しかしこのような株細胞を得て、つぎの大きな問題はその細胞の由来の同定であるが、また最も困難な点でもある。大星²⁵⁾によればその方法として①マーカーによる同定、②培養材料による同定、③異種移植による同定、④経験的除外の 4 つが挙げられているが、以下 OUR-10 につきこの 4 点を順を追って考察してみたい。

1. マーカーによる同定

① 形 態

腎細胞癌は腎近位尿管より発生する腫瘍と考えられているが、腎近位尿管の特長な構造は管腔に面した細胞膜にみられる microvilli と細胞内小器管の配置の極性であり、このような特長の一部は腎細胞癌においても認められるとされている²⁶⁾。OUR-10 には後者の特長はみられないが、細胞膜の一部には microvilli

が観察され、上皮性細胞由来を示唆している。KU-2, NRC-12 はそれぞれこのような微細細胞構造をその由来の同定の 1 つの根拠としている。

② 代謝、生化学的特性

腎細胞癌のもつ代謝、生化学的特性はいくつか考えられるが、たとえば黒色腫におけるメラニン産生や、絨毛上皮腫における HCG 産生のようなきわだった性質はまずないといって差しつかえないであろう。腎細胞癌の一部の例ではエリスロポエチン、レニン、パラホルモンなどの産生が認められる場合があるが、きわめて例外的なものであり、また臨床的にテストステロンやプロゲステロンに対し感受性を示す腎細胞癌のあることも知られてはいるが決して多いものではなく、このような特性から細胞の由来を同定することは容易ではない。KU-2、および HGEp-1 はエリスロポエチン産生能を有することから腎細胞癌と同定されているがきわめて幸運、かつ特異的な例であろう。

このため著者は培養に供された組織を含め、経験した多数例のヒト腎細胞癌組織の生化学的な特性を、Al-p と γ -GPT をマーカーとして検討を試みた。これらの詳細はすでに第 2 報¹¹⁾および第 3 報⁸⁾において詳述した通りである。

OUR-10 細胞に関するこの 2 つのマーカーの検索結果は、Al-p に関しては培養にともない母組織とは異なった isozyme への転換がみられたにもかかわらず、 γ -GTP は著者の見出した腎細胞癌に“特異”(この酵素の分布の特異性については今後さらに検討する必要はある)な γ -GTP を保持していることを確認できた。このことは OUR-10 の腎細胞癌由来を同定する 1 つの根拠であると考えている、なお LDH isozyme pattern は正常腎組織とは異なり、また由来組織に類似した pattern を呈しているが、本来この酵素の pattern は同一細胞においても培養条件をかえると変動することが知られており²⁷⁾、細胞の由来の同定の根拠とはなしえないものと思われる。

③ 染色体

過去に腎細胞癌に共通するマーカー染色体は知られていないので比較検討の方法はなく、省略する。

④ 免疫学的同定

発生母組織が共通であれば、ほぼ共通する腫瘍特異抗原が存在することはすでによく知られている。逆にこの事実を利用し、ある 1 つの癌細胞を標的とし、多数例の同一癌症例のリンパ球や血清を使用し、その殺細胞能を検討することから、その標的細胞の由来を同定することが可能であろう。OUR-10 については現在この性質は検討中の課題であり、いずれ稿を改めて

報告したい。

2. 培養材料による同定

OUR-10 は腎細胞癌原発巣組織を使用し培養が開始された細胞であり、Sautham の基準によればこれを癌細胞として認めることはできない²⁵⁾。それは正常腎を構成する上皮性細胞の混入、増殖を否定しえない点にある。しかしOUR-10 の母組織は Fig. 3 にも示したように肉眼的には正常腎実質とは明らかな境界を有しており、また組織学的にみても正常腎実質内に播種状に増殖するタイプではなく、正常腎実質部を圧迫しつつ増殖する腫瘍である。培養に供した組織内に正常尿管細胞がたとえ1つでも存在した可能性を著者は決して否定することはできないが、上にのべた病理学的所見と樹立経過からみて OUR-10 は腎細胞癌に由来した細胞であると考えている。なおヒト正常腎皮質組織を培養に供した場合にみられる上皮様細胞には前述した腎細胞癌にともなう γ -GPT isozyme は見られない(未発表)。

3. 異種移植による同定

現在最も異種移植の成功率が高いとされるヌードマウスには OUR-10 は移植不能であったが、hamster cheek pouch には短期間の間に tumor を形成し、組織学的に由来する組織と類似の所見を得た。

(4) 経験的除外

培養細胞の形態のみからは OUR-10 の腎細胞癌由来を同定することは不可能である。しかし OUR-10 は少なくとも大部分が腫瘍細胞である細胞浮遊液より培養が開始されており、またきわめて短時間のうちに活発に増殖する単層細胞となっている。さらにその形態は培養経過とともに細胞のやや大型化、より上皮様細胞化がわずかに認められるが、著明な変化もなく、また細胞層の一部からの急激な増殖により得られた細胞でもない。また full sheet の状態では癌細胞の形態の1つの特長とされる piling up の傾向も認められる。以上のような点からも OUR-10 はヒト腎細胞癌細胞そのものが増殖してきた細胞であると考えられる。

以上のべてきたように OUR-10 のヒト腎細胞癌由来は形態学的、生化学的に明らかにされたものと考えているが、最近株細胞で問題となっている HeLa 細胞の混交の可能性につき簡単にのべてみたい^{28,29)}。HeLa 細胞の特長は、G6PD の phenotype が A 型であること¹⁰⁾、Al-p が胎盤性 Al-p を含め、非常に多様なアイソザイムを有すること³⁰⁾、および HLA 抗原 A 3, 28; BW 35, 一、をもつことであるが³¹⁾、OUR-10 はこのいずれの点からみて HeLa も細胞の

混交は否定しうるものである。LDH isozyme pattern も異なっている。

最後に、ある1人の症例より癌細胞株を得、さらにそれを研究に供することは確かに非常に有益な情報をもたらす可能性が高く、OUR-10 もすでにこのような研究に利用されはじめている^{32~33)}。しかしこのような成績は、たとえ発生母組織が同一であったりしても他の症例にまで一般化することは非常に危険でもある。ところが反面、たとえばただ2つの膀胱癌細胞 T-24 と MANO を使用することにより、ヒト膀胱癌症例の腫瘍免疫反応が詳細に把握されつつあることも事実である³⁴⁾。このようなことを考慮すると同じ種類の腫瘍より多数の株細胞を作成し、それぞれについての知識を集積してゆくことが今後研究、さらにはヒト腎細胞癌の治療成績向上のためにはどうしても必要なものと思われるが、OUR-10 はその由来が明確なことから、その研究の一部を担うに適した細胞株であると思われる。

結 語

32歳女子の腎細胞癌組織より OUR-10 細胞株を樹立、この細胞の形態学的、生化学的検討よりヒト腎細胞癌由来を明らかとし、報告した。

本研究の一部は文部省科学研究費(No.137054)の補助を受けたものである。

染色体分析につき種々御教示下さった京都府立医科大学、阿部達生博士、およびヌードマウス移植実験につき親切に御協力下さった京都大学、岡田謙一郎博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 松田 稔・長船匡男・古武敏彦・園田孝夫・渡辺 信一郎・波田寿一：泌尿紀要，24：27，1978。
- 2) Matsuda, M., Osafune, M., Nakano, E., Kotake, T., Sonoda, T., Watanabe, S., Hada, T., Okochi, T., Higashino, K., Yamamura, Y. and Abe, T.: Cancer Res., in press.
- 3) 松田 稔・長船匡男・古武敏彦・園田孝夫・渡辺 信一郎・波田寿一・東野一彌・山村雄一：第37回日本癌学会総会記事，p. 120，1978。
- 4) Kaufman, J. J. and Lichtenauer, P.: Br. J. Urol., 39: 490, 1967.
- 5) Bakey, B. and Nyhan, W. L.: Biochem. Genet., 3: 571, 1969.
- 6) Morton, R. K.: Biochem. J., 57: 595, 1954.

- 7) 荻田善一：代謝, 2: 67, 1965.
- 8) 波田寿一・東野一彌・山本英雄・渡辺信一郎・松田 稔・長船匡男・宇佐美道之・古武敏彦・園田孝夫：泌尿紀要, 24: 631, 1978.
- 9) Terasaki, P. I. and MacClelland, J. D.: Nature, 204: 998, 1964.
- 10) Yoshida, A., Watanabe, S. and Gartler, S. M.: Biochem. Genet., 5: 553, 1971.
- 11) 松田 稔・長船匡男・宇佐美道之・古武敏彦・園田孝夫・波田寿一・渡辺信一郎・大河内寿一・東野一彌：泌尿紀要, 24: 619, 1978.
- 12) 勝岡洋治：日泌尿会誌, 69: 285, 1978.
- 13) 小松原秀一：日泌尿会誌, 69: 1535, 1978.
- 14) 田島知行・飯田邦仁・赤塚 明・渡辺敏輝・玉置憲一：第36回日本癌学会総会記事, p. 134, 1977.
- 15) Jones, G. W.: Cancer, 20: 1893, 1967.
- 16) Daly, J. J., Prout, G. R., Jr., Ahl, C. A. and Lin, J. C.: J. Urol., 111: 448, 1974.
- 17) Elhilali, M. M. and Nayak, S. K.: Invest. Urol., 13: 60, 1975.
- 18) Hakala, T. R., Castro, A. E., Elliott, A. Y. and Fraley, E. E.: Invest. Urol., 11: 405, 1974.
- 19) Giard, D. J., Aaronson, S. A., Tadaro, D. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. and Parks, W. P.: J. Natl. Cancer Inst., 51: 1417, 1973.
- 20) Schacter, B., Braun, W. E., Bukowski, R. and Deodhar, S.: Transplant. Proc., 9: 1849, 1977.
- 21) Williams, R. D., Elliott, A. Y., Stein, N. and Fraley, E. E.: In vitro, 12: 623, 1976.
- 22) Hoehn, W. and Schroeder, F. H.: Invest. Urol., 16: 106, 1978.
- 23) 堀田 進・大山昭夫編：組織培養, 基本と実際, p. 89, 永井書店, 大阪, 1976.
- 24) Hayflick, L.: Exp. Cell Res., 37: 614, 1965.
- 25) 大星章一・菅野晴夫編：人癌細胞の培養, p. 97~104, 朝倉書店, 東京, 1975.
- 26) Seljelid, R. and Ericsson, J. L. E.: Lab. Invest., 14: 435, 1965.
- 27) Cribbs, R. N. and Kline, E. S.: J. Cell. Physiol., 78: 59, 1971.
- 28) Culliton, B. J.: Science, 184: 1058, 1974.
- 29) Nelson-Rees, W. A., Flandermeyer, R. R. and Howthorne, P. K.: Science, 184: 1093, 1974.
- 30) Benham, F. J., Povey, M. S. and Harris, H.: Somat. Cell Genet., 4: 13, 1978.
- 31) Hsu, S. H., Schacter, B. Z., Delaney, N. L., Miller, T. B., McKusick, V. A., Kennett, R. H., Bodmer, J. G., Young, D. and Bodmer, W. F.: Science, 191: 392, 1976.
- 32) Okochi, T., Seike, H., Higashino, K., Hada, T., Watanabe, S., Yamamura, Y., Ito, F., Matsuda, M., Osafune, M., Kotake, T. and Sonoda, T.: Cancer Res., 39: 1829, 1979.
- 33) 石橋道男・有馬正明・宇佐美道之・佐川史郎・園田孝夫・市川靖二・井原英有・福西孝信・永野俊介・秋山隆弘・栗田 孝：第1回臨床移植免疫研究会(別冊), p. 79, 1978.
- 34) Troye, M., Perlmann, P., Larsson, A., Blomgren, H. and Johanson, B.: Int. J. Cancer, 20: 188, 1977.

(1979年10月23日受付)